

日本特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

31.03.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

2003年 4月15日

出願番号
Application Number:

特願2003-110821

[ST. 10/C]:

[JP2003-110821]

REC'D 24 JUN 2004

WIPO

PCT

出願人
Applicant(s):

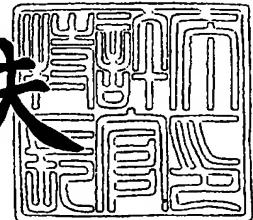
社団法人芝蘭会

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 Y2002-P488
【提出日】 平成15年 4月15日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 5/06
A61P 15/08

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区聖護院川原町 34 池端マンション
302号室

【氏名】 篠原 隆司

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区聖護院川原町 34 池端マンション
302号室

【氏名】 篠原 美都

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100080034

【弁理士】

【氏名又は名称】 原 謙三

【電話番号】 06-6351-4384

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003229

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0111475

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 精子幹細胞の生体外における増殖方法、その方法を利用して増殖された精子幹細胞、および精子幹細胞の生体外増殖に用いられる培地添加剤キット

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、白血病抑制因子（LIF）、および仔ウシ血清（FCS）を含む培地と、

フィーダー細胞としてマウス胎児線維芽細胞（MEF）とを用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させることを特徴とする精子幹細胞の増殖方法。

【請求項 2】

上記培地には、上皮細胞成長因子（EGF）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）のうちの少なくとも何れかがさらに含まれることを特徴とする請求項1記載の精子幹細胞の増殖方法。

【請求項 3】

哺乳類由来の精子幹細胞を用いることを特徴とする請求項1または2記載の精子幹細胞の増殖方法。

【請求項 4】

上記グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）は、濃度0.5～50ng/mlで上記培地中に含まれることを特徴とする請求項1ないし3の何れか1項に記載の精子幹細胞の増殖方法。

【請求項 5】

上記白血病抑制因子（LIF）は、濃度 10^2 ～ 10^4 units/mlで上記培地中に含まれることを特徴とする請求項1ないし4の何れか1項に記載の精子幹細胞の増殖方法。

【請求項 6】

上記仔ウシ血清（FCS）は、上記精子幹細胞の培養開始時の培地中には、濃度0.1～5%で含まれ、上記精子幹細胞を継代した後の培地中には、濃度0.

1～20%で含まれることを特徴とする請求項1ないし5の何れか1項に記載の精子幹細胞の増殖方法。

【請求項7】

上皮細胞成長因子（EGF）は、濃度0.5～50ng/mlで上記培地中に含まれることを特徴とする請求項2ないし6の何れか1項に記載の精子幹細胞の増殖方法。

【請求項8】

上記塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）は、濃度0.5～50ng/mlで上記培地中に含まれることを特徴とする請求項2ないし7の何れか1項に記載の精子幹細胞の増殖方法。

【請求項9】

上記マウス胎児線維芽細胞（MEF）は、培養開始から遅くとも4週間経過後にはフィーダー細胞として用いられることを特徴とする請求項1ないし8の何れか1項に記載の精子幹細胞の増殖方法。

【請求項10】

請求項1ないし9の何れか1項に記載の増殖方法を用いて、生体外で増殖された精子幹細胞。

【請求項11】

請求項10記載の精子幹細胞を含んでなる不妊治療剤。

【請求項12】

グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、および仔ウシ血清（FCS）と、上皮細胞成長因子（EGF）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）のうちの少なくとも何れか一方とを含んでなり、精子幹細胞を生体外で増殖させるための培養培地に添加して使用される培地添加剤キット。

【請求項13】

白血病抑制因子（LIF）をさらに含むことを特徴とする請求項12記載の培地添加剤キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、哺乳類などの精子幹細胞を生体外（in vitro）で増殖させる方法、その方法を利用して増殖された精子幹細胞、および、精子幹細胞の生体外での増殖に用いられる培地添加剤キットに関するものである。

【0002】**【従来の技術】**

哺乳類精巣の精子幹細胞は、成体で無限に増殖し続け、減数分裂を経て精子形成に至る源となる細胞である。精子幹細胞は次世代へ遺伝子を引き継ぐために分配される、成体における唯一の幹細胞であるため、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジーに有用である。

【0003】

Brinsterらは、1994年にin vivoで精子幹細胞を移植することに成功した（非特許文献1参照）。この方法では精巣を形成する精細管内に幹細胞を移植するとコロニーをつくり、ドナー細胞由来の精子形成を起こし、仔をつくることができるというものである。これによって、ES細胞以外にも生殖系列細胞を操作する新しい可能性が切り開かれ、精子幹細胞を用いた発生工学という新しい分野が確立された。さらに、最近の研究では、いくつかの精子幹細胞が試験管内で3ヶ月以上生存可能であるということが報告されている（非特許文献2参照）。そして、非特許文献3、4や特許文献1では、精子幹細胞を増殖させたり、長期的に維持したりする方法について記載されている。

【0004】

ところで、昨今種々のバイオテクノロジー技術を利用して、トランスジェニック動物（特にノックアウト動物）を作製する方法が開発され、ノックアウトの作製や家畜の品種改良などに利用されている。このトランスジェニック動物を作製する方法としては、例えば、体細胞核移植法、ES細胞を用いる方法、前核への遺伝子注入法などが挙げられる。

【0005】

体細胞核移植法は、現在のところ、ウシやブタなどの家畜でノックアウトができる唯一の方法であると考えられるが、非常に効率が悪く奇形も多く、それに伴

って費用も高いという問題点を有している。

【0006】

ES細胞を用いる方法は、ノックアウトが簡単に効率よく作製できるということから、現在マウスにおいては有効に利用されている。しかしながら、マウス以外（例えば、ブタやウシなどの家畜や霊長類）では、生殖細胞をつくる能力を有するES細胞が採れておらず、この手法によるノックアウトは未だ報告されていない。また、ES細胞を用いて生殖系列の細胞を作製する場合には、ES細胞が生殖系列以外の細胞に分化する多能性を有しているため、精細管の中に移植すると癌化するという危険性を有している。

【0007】

また、前核への遺伝子注入法は、マウスのトランスジェニック作製においては標準的な方法であり実用化されている。しかしながら、マウス以外の動物では、その成功率は非常に低く（例えば、ブタでは1%前後、ウシでは1%以下）、非常にコストがかかり現実的ではない。

【0008】

【非特許文献1】

Brinster RL, Zimmermann JW, Spermatogenesis following male germ-cell transplantation, Proc Natl Acad Sci USA 1994年、91巻、11298-11302頁

【0009】

【非特許文献2】

Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL, Culture of mouse spermatogonial stem cells, Tissue Cell 1998年、30巻、389-397頁

【0010】

【非特許文献3】

Feng L-X, Chen Y, Dettin L, Reijo Pera RA, Herr JC, Goldberg E, Dym M, Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line, Science, 2002年、297巻、392-395頁

【0011】**【非特許文献4】**

van Pelt AMM, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Creemers LB, de Rooij DG, van Dissel-Emiliani FMF、Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics、Endocrinology、2002年、143巻、1845-1850頁

【0012】**【特許文献1】**

特表2001-517927（公表日：平成13年10月9日）

【0013】**【発明が解決しようとする課題】**

このようなトランスジェニック動物の作製において、上述の精子幹細胞を利用することができれば、幹細胞は無限の増殖能力を持つため、ES細胞と同様の手法が適用でき、簡単に効率よくノックアウトを作製することができる期待されている。

【0014】

しかし、これらの細胞を試験管内で実用可能なレベルまで増殖させ、操作するという試みについては、未だ成功例はない。

【0015】

具体的には、非特許文献2に記載の方法では、精子幹細胞がin vitroで3ヶ月以上存続することが報告されているが、幹細胞が増殖したという根拠は示されていない。また、特許文献1や非特許文献3、4などに記載された培養方法を用いて、精子幹細胞を試験管内で培養しても、生存可能ではあるが、1週間でもとの細胞数の20%程度に減ってしまうというのが現状であり、細胞を増殖させることは不可能である。このように、従来の手法では、精子幹細胞を操作してバイオテクノロジーなどに応用しようとするには限界がある。また、試験管内で長期間持続的に培養された精子幹細胞を用いて、精子形成が実際に行われた例はこれまでに報告されていない。

【0016】

本発明は上述の問題点に鑑みて成されたものであり、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジーに有効に利用することのできる精子幹細胞を、発生工学的に利用可能な程度に生体外で増殖させる方法、その方法を利用して増殖された精子幹細胞、および精子幹細胞の生体外増殖に用いられる培地添加剤キットを提供するものである。

【0017】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、精子幹細胞の生体外（*in vitro*）での増殖法について鋭意検討した。そして、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、白血病抑制因子（LIF）、および仔ウシ血清（FCS）の存在下で、新生児マウスの精巣から単離された精子幹細胞を培養させると、5ヶ月以上の期間にわたって増殖（10-14倍）させることができることを見出した。さらに、培養された精子幹細胞を細精管に移植したところ、先天的に生殖力のないマウスの生殖力を回復することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0018】

本発明の精子幹細胞の増殖方法は、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、白血病抑制因子（LIF）、および仔ウシ血清（FCS）を含む培地と、フィーダー細胞としてマウス胎児線維芽細胞（MEF）とを用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させることを特徴としている。

【0019】

すなわち、上記の精子幹細胞の増殖方法の特徴点は、以下の2点であると言える。それゆえ、本発明に係る増殖方法を実施するために精子幹細胞の培養を行う場合に、以下の2点の特徴点以外の培養条件については、従来公知の方法に従つて行うことができる。

- (1) 精子幹細胞を培養するための培地（培養液）に、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、白血病抑制因子（LIF）、仔ウシ血清（FCS）が含まれるという点
- (2) 細胞培養時にフィーダー細胞としてマウス胎児線維芽細胞（MEF）を用いるという点

上記の方法によれば、これまで生体外（すなわち、in vitro）で長期間増殖させることができなかつた精子幹細胞を増殖させることが可能となる。これによって、各分野への応用が期待されていながら、これまで効率的な増殖方法が見つかっていなかつたために、その応用範囲が制限されていた精子幹細胞を有効に利用することが可能となる。

【0020】

具体的には、精子幹細胞は、トランスジェニック動物の作製、ヒトの男性の不妊治療および不妊薬剤、ヒトの生殖細胞レベルにおける遺伝子治療のための研究および薬剤の開発などに応用可能である。そして、これらの応用方法には、精子幹細胞の増殖というステップが必須のものであるため、本発明の精子幹細胞の増殖方法が非常に有効であり、利用価値が高いと言える。

【0021】

本発明の精子幹細胞の増殖方法においては、上記培地中に、上皮細胞成長因子（EGF）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）のうちの少なくとも何れかがさらに含まれることが好ましい。

【0022】

一般に、幹細胞の培養には、EGFおよびbFGFのうちの何れかが含まれることによって、安定した細胞の培養を実施できる。それゆえ、本発明の場合にも、EGFおよびbFGFのうちの何れかを少なくとも含むことによって、安定した精子幹細胞の培養を行うことができる。

【0023】

本発明の精子幹細胞の増殖方法においては、哺乳類由来の精子幹細胞を用いることが好ましい。

【0024】

上記哺乳類としては、例えば、マウス、ラット、ウサギなどの実験動物、ブタ、ウシ、ヤギなどの家畜、ヒト、サル、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類を挙げることができる。上記実験動物は、文字通り医薬品などの開発のための実験用動物として有用である。上記家畜もまた食用などに用いられ、人間生活にとって有用である。また、霊長類は、分類学的にヒトにより近く、ヒトにおける

る種々の疾病のメカニズムの解明や、生殖細胞の分化のメカニズムの解明などに利用できるため、有用である。

【0025】

このように、上記の方法によれば、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジー、畜産などといった種々の分野で有用な哺乳類において、その精子幹細胞を増殖させることができると、その価値は高いと言える。

【0026】

本発明の精子幹細胞の増殖方法において、上記グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）は、濃度0.5～50ng/mlで上記培地中に含まれることが好ましい。

【0027】

また、本発明の精子幹細胞の増殖方法において、上記白血病抑制因子（LIF）は、濃度 10^2 ～ 10^4 units/mlで上記培地中に含まれることが好ましい。

【0028】

また、本発明の精子幹細胞の増殖方法において、上記仔ウシ血清（FCS）は、上記精子幹細胞の培養開始時の培地中には、濃度0.1～5%で含まれ、上記精子幹細胞を継代した後の培地中には、濃度0.1～20%で含まれることが好ましい。

【0029】

さらに、本発明の精子幹細胞の増殖方法において、上皮細胞成長因子（EGF）が上記培地中に含まれる場合、その濃度は0.5～50ng/mlであること好ましい。

【0030】

また、本発明の精子幹細胞の増殖方法において、上記塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）が上記培地中に含まれる場合、その濃度は0.5～50ng/mlであることが好ましい。

【0031】

精子幹細胞を培養するための上記培地が、上述のような濃度で各因子（GDNF、EGF、bFGF、LIF、およびFCS）を含むことによって、精子幹細

胞の培養をより安定化して、精子幹細胞の増殖率を高めることができる。

【0032】

さらに、本発明の精子幹細胞の増殖方法において、上記マウス胎児線維芽細胞（M E F）は、培養開始から遅くとも4週間経過後にはフィーダー細胞として用いられることが好ましい。

【0033】

上記の方法によれば、精子幹細胞がマウス胎児線維芽細胞（M E F）に接着し、効率的にコロニー形成を行うことができる。

【0034】

本発明の精子幹細胞は、上述の各増殖方法によって生体外（すなわち、in vitro）で増殖されたものである。

【0035】

上記の精子幹細胞は、上述の増殖方法によって実用可能なレベルにまで増殖されたものであるため、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジーなどといった種々の分野において発生工学的に利用することができる。

【0036】

なお、上記の精子幹細胞の利用方法の一例として、ヒト男性の不妊治療のための薬剤として利用する方法が挙げられる。それゆえ、上記の精子幹細胞を含んでなる不妊治療剤も本発明に含まれる。

【0037】

また、本発明の培地添加剤キットは、グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）、および仔ウシ血清（F C S）と、上皮細胞成長因子（E G F）、塩基性線維芽細胞成長因子（b F G F）のうちの少なくとも何れか一方とを含んでなり、精子幹細胞を生体外で増殖させるための培養培地に添加して使用されるものである。

【0038】

上記の構成によれば、精子幹細胞のin vitroでの培養用培地に添加することによって、従来は増殖させることができた精子幹細胞を大幅に培養させることができる。なお、精子幹細胞の培養開始時には、上記のG D N F、F C Sお

より、EGFおよび／またはbFGFという各因子以外に、LIFが必須の因子となる。上記の培地添加剤キットはLIFを含まないため、精子幹細胞の培養が確立された後の培養を維持する場合の培地添加剤キットとして（すなわち、継代後の培養用培地の添加剤キットとして）、利用することが好ましい。

【0039】

また、精子幹細胞の培養開始時に、上記の培地添加剤キットを用いる場合には、上記培地添加剤キットとは別にLIFを添加して利用するということも可能であるが、上記培地添加剤キットに、白血病抑制因子（LIF）がさらに含まれていてもよい。

【0040】

上記の構成によれば、精子幹細胞の培養開始時に、培地調製を簡便化する培地添加剤キットとして好適に利用することができるとともに、上記の培地添加剤を精子幹細胞の培養維持における培地中に添加すれば、精子幹細胞の増殖効率をより高めることができる。

【0041】

【発明の実施の形態】

以下、本発明についてより具体的に説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。

【0042】

本実施の形態では、特に哺乳類の精子幹細胞のin vitroでの増殖方法について説明する。この哺乳類の精子幹細胞の増殖方法は、培養培地にグリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、上皮細胞成長因子（EGF）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、白血病抑制因子（LIF）、および仔ウシ血清（FCS）を含み、フィーダー細胞としてマウス胎児線維芽細胞（MEF）を用いて増殖を行うものである。

【0043】

より具体的にマウスの精子幹細胞を例に挙げれば、本実施の形態の精子幹細胞の増殖方法は、以下の（1）～（5）に示す手順に従って実施することができる。

(1) 生直後のマウスの精巣をコラゲナーゼ、トリプシン、DNaseでバラバラに分解する。

(2) single cellになった精巣の細胞をゼラチンコートしたプレートの上に播く。この時に用いる培養液（すなわち、培地）は、例えば、StemPro-34をベースにしたものであり、当該培養液中には、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、上皮細胞成長因子（EGF）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、および白血病抑制因子（LIF）という複数の細胞増殖因子、および仔ウシ血清（FCS）が含まれる。

(3) 培養開始後、10日から2週間でトリプシン処理を行い、1倍または1/2倍の濃度で細胞を継代する。

(4) (3)に示す継代を2～3回繰り返した後、今度は、フィーダー細胞であるマウス胎児線維芽細胞（MEF）上に培養した細胞を移して培養を続ける。ここで述べているように、精子幹細胞は、継代を2～3回繰り返した後、すなわち、培養開始から遅くとも4週間経過後までには、マウス胎児線維芽細胞（MEF）上に移されることが好ましい。

(5) 培養開始後、3～4週間で生殖細胞のコロニーは安定し、以後数ヶ月にわたり、3～5日の間隔で1/3～1/4の希釈でトリプシン処理によって継代する。

【0044】

上述のような手順に基づいて、in vitroでマウスの精子幹細胞の増殖を行うと、後述の実施例に示されるように、培養の初めから比較すると、5ヶ月間で10¹⁴倍まで増殖させることができる。

【0045】

なお、マウスの精巣内の精子幹細胞の数は極めて少なく、精巣の細胞1万個当たりわずか約2～3個と見積もられている。この精子幹細胞を、従来法に基づいてin vitroで培養しても、1週間程度で初めの数の約20%程度に減ってしまい、幹細胞の増殖を起こす条件が見つからなかった。そのため、発生工学的に多くの利用可能性が考えられたにもかかわらず、精子幹細胞を発生工学に利用することは困難であった。

【0046】

これに対し、本発明の精子幹細胞の増殖方法によれば、長期的かつ大幅な細胞増殖が可能となった。さらに、本増殖方法で得られた精子幹細胞は、実施例にも示されるように、不妊マウスの精細管の中に移植することによって、当該精子幹細胞由来の精子形成が長期に渡って起こり、その精子由来の仔をつくることができる事が確認されている。すなわち、本発明の精子幹細胞の増殖方法によって得られた精子幹細胞由来の精子は、実際の精子として機能することが確認されている。

【0047】

それゆえ、本増殖方法によって得られた精子幹細胞は、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジーという各分野における種々の技術開発のために有効に利用されることが期待できる。なお、この精子幹細胞の増殖方法は、精子幹細胞の持続的な増殖が確認されるとともに、それ由来の精子を形成し、さらにはその精子由来の仔をつくることができるということが明確に示された初めての手法である。

【0048】

本実施の形態では、上述のように精子幹細胞の培養培地に、GDNF、EGF、bFGF、LIF、およびFCSが含まれている。しかし、本発明はこれに限定されるものではなく、上記培養培地中に、少なくともグリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、白血病抑制因子（LIF）、および仔ウシ血清（FCS）が含まれていればよい。これ以外の構成要素としては、従来から精子幹細胞の培養に用いられてきたもの（例えば、上皮細胞成長因子（EGF）、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）など）を適宜使用することができる。上記培地の具体的な一例は、後述の実施例に示される。

【0049】

なお、上記の精子幹細胞の増殖方法においては、培養を確立させる際（すなわち、培養開始時）の培地として、GDNF、LIF、およびFCSは必須の要素であるが、培養が確立された後の培養を維持する際の培地（すなわち、継代後の培地）には、上記LIFは含まれなくても細胞を維持することは可能である。し

かし、継代後の培地に上記L I Fが含まれることによって、精子幹細胞の増殖率をより上昇させることができる。

【0050】

また、精子幹細胞の増殖率を高めるために、上記各成長因子、白血病抑制因子、および仔ウシ血清の培地中の濃度は、上記グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）については $0.5 \sim 50 \text{ ng/m l}$ が好ましく、上皮細胞成長因子（E G F）については $0.5 \sim 50 \text{ ng/m l}$ が好ましく、上記塩基性線維芽細胞成長因子（b F G F）については $0.5 \sim 50 \text{ ng/m l}$ が好ましく、上記白血病抑制因子（L I F）については $10^2 \sim 10^4 \text{ units/m l}$ が好ましい。

【0051】

また、上記仔ウシ血清（F C S）については、培養開始時の培地（すなわち、試験管培養における第1回目の培地）中に、濃度 $0.1 \sim 5\%$ という低濃度で含まれることによって、精子幹細胞の培養を安定して確立させることができる。なお、それ以外の培地（すなわち、継代後の培地）では、より高濃度の 20% 程度まで含まれていてもよい。

【0052】

そして、上記各成長因子、白血病抑制因子、および仔ウシ血清の培地中の濃度は、上記グリア細胞由来神経栄養因子（G D N F）については $2 \sim 20 \text{ ng/m l}$ がより好ましく、上皮細胞成長因子（E G F）については $2 \sim 30 \text{ ng/m l}$ がより好ましく、上記塩基性線維芽細胞成長因子（b F G F）については $2 \sim 20 \text{ ng/m l}$ がより好ましく、上記白血病抑制因子（L I F）については $3 \times 10^2 \sim 5 \times 10^3 \text{ units/m l}$ がより好ましい。また、精子幹細胞の培養開始時の培地において、上記仔ウシ血清（F C S）の濃度は、 $0.5 \sim 2\%$ であることがより好ましい。上記の濃度で各因子が培地中に含まれることによって、精子幹細胞の培養を確実に確立させ、精子幹細胞の増殖率をより一層高めることができる。

【0053】

続いて、本発明に係る精子幹細胞、すなわち、上記の増殖方法によって増殖された精子幹細胞の利用方法について説明する。

【0054】

本発明の精子幹細胞は、上記の増殖方法によって大幅に増殖されているため、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジーなどといった種々の分野において発生工学的に利用することができる。この精子幹細胞の主な利用方法には、以下に示すようなものが挙げられる。

- (a) 新規なトランスジェニック動物の作製
- (b) ヒト男性の不妊治療
- (c) ヒトの生殖細胞レベルにおける遺伝子治療

上記 (a) では、精子形成の源となる精子幹細胞に外来遺伝子を導入するなどの操作を行い、その外来遺伝子が導入された精子幹細胞を精細管に移植することによって、精子形成を行う。そして、得られた精子を卵細胞に受精させるという手法を用いてトランスジェニック動物を作製することができる。

【0055】

この手法は、ES細胞を利用したトランスジェニック動物の作製方法と同様のものであるが、ES細胞では、生殖系列以外の細胞に分化する多能性があり、精細管に移植した場合に癌化する危険性を有している。それに対し、本発明の精子幹細胞を用いた場合には、精細管に移植しても癌化することなく、正常な精子を形成することができる。それゆえ、上記精子幹細胞を用いれば、簡単に効率よくトランスジェニック動物を作製することができる。この精子幹細胞を用いたトランスジェニック動物の作製は、現在有効な作製方法が見出されていない家畜動物や霊長類などの哺乳類におけるトランスジェニック動物の作製方法として利用できる可能性を有している。

【0056】

上記 (b) では、例えば、不妊患者の精巣からバイオプシーで精子幹細胞を採取し、本発明の増殖方法によって試験管中で増殖させる。そして、当該不妊患者の精細管中に増殖した精子幹細胞を注入（マイクロインジェクション）して、患者の精巣の精細管の中に培養細胞由来の精子形成を起こさせるという手法によつて、実施することができる。この手法は、例えば、化学療法や放射線治療によつて不妊になった場合に、特に効果的である。

【0057】

このように、上記精子幹細胞はヒト男性の不妊治療に利用可能であるため、上記精子幹細胞を含む特に男性を対象とした不妊治療剤も本発明の範囲内である。

【0058】

上記(c)のヒトの生殖細胞レベルにおける遺伝子治療とは、例えば、特定の遺伝子が変異を持っている場合に、この遺伝子を正常に機能する遺伝子と置き換えて精子幹細胞を作製し、その変異が子孫に伝わらないようにするという治療方法である。このような治療方法においても、精子幹細胞の維持および増殖が必要となるが、この場合に、本発明の精子幹細胞の増殖方法を有効に利用することができる。

【0059】

次に、本発明に係る培地添加剤キットについて説明する。本発明の培地添加剤キットは、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、および仔ウシ血清(FC S)と、上皮細胞成長因子(EGF)、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)のうちの少なくとも何れか一方とを含んでなり、精子幹細胞を生体外で増殖させるための培養培地に添加して使用されるものである。そして、この培地添加剤キットには、白血病抑制因子(LIF)がさらに含まれることが好ましい。

【0060】

上記培地添加剤キットは、精子幹細胞を培養する際に、通常用いられる細胞培養培地に添加して使用することができる。この培地添加剤キットを添加することによって、精子幹細胞をin vitroで大幅に増殖させることができる。より具体的には、実施例の場合であれば、5ヶ月間で 10^{14} 倍に増殖させることができる。また、このようにキットとして各成長因子、白血病抑制因子および仔ウシ血清が適当な混合割合で含まれているため、精子幹細胞の培養を簡便に行うことが可能となる。

【0061】

なお、上記培地添加剤キットに白血病抑制因子(LIF)がさらに含まれることによって、特に精子幹細胞の培養開始時の培養培地への添加剤キットとして有效地に利用できる。それに加えて、精子幹細胞の増殖率をより上昇させることができ

きるとともに、L I F を別途添加する必要もなくなり培地の作製をより簡便化することができる。

【0062】

なお、上記培地添加剤キットに含まれる各成長因子、白血病抑制因子および仔ウシ血清の混合割合は、精子幹細胞培養培地に添加された場合の各因子の培地中の濃度が、上述の好適な範囲内に入るように構成されることが好ましい。また、上記培地添加剤キットには、上記の物質以外に、上記各物質を安定して維持するためのインスリン、トランスフェリン、B S A、2-ME、エストラジオール、プロゲステロンなどが適宜含まれていてもよい。

【0063】

【実施例】

以下、本発明の実施例について、図面を用いて説明するが、本発明はこの記載に限定されるものではない。

【0064】

〔1〕実験方法および実験材料

（1）実験に用いた動物について

先ず、本実験に使用された動物について説明する。

【0065】

精巣細胞は、大阪大学の岡部博士より提供されたトランスジェニックマウス系統C57BL6/Tg14 (act-EGFP-0sbY01) と、D B A/2というマウスの系統とをかけあわせて得られた、生まれたばかりのマウスから、2段階酵素分解によって集められ、培養に使用された（参考文献1：Okabe M et. al., 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells, FEBS Lett, 407巻、313-319頁、1997年）。これらのマウスの精原細胞および精母細胞E G F P 遺伝子を発現し、その発現レベルは減数分裂後に徐々に減少する。それゆえ、ドナー細胞は後に行われる移植を容易に特定することができる。

【0066】

培養された細胞は、B A L B/C ヌードマウスあるいはW仔マウス（生後5～10日、Japan SLC製）へ移植された。内因性の精子形成を避けるために、ヌー

ドマウスは、生後6週間の時期にブスルファン（44mg/kg）で処理され、続いて、死亡率を抑えるために対応する骨髄細胞が注射された。W受容体を使用した実験では、50μgの抗CD4抗体（GK1.5）が、移植から0、2、4日後に腹腔内に投与され、異質遺伝子的なドナー細胞への耐性が誘導された。全ての動物実験のプロトコルは、京都大学の動物保護および使用制度委員会によつて承認されたものである。

【0067】

(2) 培養条件

続いて、本実験における精子幹細胞の培養条件について説明する。

【0068】

分離された精巣細胞は、ゼラチンコートされた組織培養プレートに配分された。精巣細胞用の培養培地は、StemProサプリメント（Invitrogen製）、25μg/ml インスリン、100μg/ml トランスフェリン、60nM プトレシン、30nM セレン酸ナトリウム、6mg/ml D-(+)-グルコース、30μg/ml ピルビン酸、1μl/ml DL-乳酸（シグマ製）、5mg/ml ウシアルブミン（ICN バイオメディカル製）、2mM L-グルタミン、5×10⁻⁵M 2-メルカプトエタノール、MEM非必須ビタミン溶液（Invitrogen製）、10⁻⁴M アスコルビン酸、10μg/ml d-ビオチン、30ng/ml β-エストラジオール、60ng/ml プロゲステロン（Sigma製）、20ng/ml マウス上皮細胞成長因子（EGF：Becton Dickinson製）、10ng/ml 塩基性線維芽細胞成長因子：bFGF（Becton Dickinson製）、10³units/ml ESGRO（マウス白血病抑制因子：LIF、Invitrogen製）、10ng/ml 組換えラットGDNF（R&Dシステムズ製）、1%仔ウシ血清（JRH バイオサイエンス製）が添加されたStemPro-34 SFM（Invitrogen製）を使用した。細胞は5%の二酸化炭素を含む空気中で、37℃で維持された。

【0069】

(3) 抗体染色

上記(2)の培養条件で培養された細胞の性質を確認するために、従来公知の精

子形成細胞に対する分子マーカーの発現を調べるフローサイトメトリーが、以下のようにして実施された。

【0070】

一次抗体として、ラット抗EpCAM (G8.8)、マウス抗SSEA-1 (MC-480)（発生研究ハイブリドーマバンク、アイオワ大学）、ラット抗ヒト α 6-インテグリン (CD49f) (GoH3)、ビオチン標識された抗ラット β 1-インテグリン (CD29) (Ha2/5)、APC-接合ラット抗マウスc-kit (CD117) (2B8) (BDバイオサイエンス製)、ラット抗TDA抗体 (EE2) (大阪大学西宗博士から提供)、APC-接合ヤギ抗ラットIgG (Cedarlane研究所製) が使用された。

【0071】

APC-接合ヤギ抗ラットIgG (Cedarlane研究所製)、APC-接合ストレプトアビジン (BDバイオサイエンス製)、あるいは、Alexa Fluor 633-接合ヤギ抗マウス IgM (Molecular Probe製) が、二次抗体として使用された。細胞染色技術は、参考文献2 (Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL, β 1-and- α 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells, Proc Natl Acad Sci USA、1999年、96巻、5504-5509頁) の記載に従って実施した。細胞はFACS-Calibur システム (BDバイオサイエンス製) で分析した。

【0072】

(4) 培養された精子幹細胞の移植

上記の培養方法によって得られた精子幹細胞を含む約 $8\ \mu l$ のドナー細胞懸濁液は、ヌード受容体精巣の精細管に注入された。 $2\ \mu l$ のドナー細胞懸濁液は、輸出管を通してW仔マウスの精巣へ導入された。各受容体の精巣では、注入物が細管の75～80%を占めた。成体の受容体マウスは、アバーティンインジェクション (640mg/kg) によって麻酔された。

【0073】

コロニーをカウントするために、受容体マウスのテストでは、ドナー細胞移植後7～8週間で受容体精巣を摘出し、紫外線下で蛍光を観察することによって解析された。ホストの精巣細胞は内因性の蛍光発光を有しないため、ドナー細胞は、明確に特定された。細胞の集団は、精細管の全周囲を占め、少なくとも0.1

mmの長さを有する場合に、コロニーと定義された。

【0074】

(5) 顕微受精

受容体マウスの精巣の中から培養細胞由来の精子を取り出し、以下のような方法で顕微受精が実施された。

【0075】

移植実験の精細管は、精密に分析され、精子形成細胞は機械的に集められた。顕微受精は、参考文献3 (Kimura Y, Yanagimachi R, Intracytoplasmic sperm injection in the mouse, Biol Reprod, 1995年、52巻、709-720頁) に記載のように実施された。培養において24時間経過後の四細胞段階に達した胚（胎児）は、day-1の偽妊娠したICR雌の輸卵管へ移送された。19.5日目に取り出された生育胎児は、ICR親マウスの授乳によって育てられた。

【0076】

[2] 結果

続いて、上記の方法で行った本実験の実験結果を以下の(1)から(4)に示す。

【0077】

(1) マウス精子幹細胞の試験管内培養について

新生児DBA/2マウスの精巣細胞は、酵素学的に分散され、GDNF、bFGF、EGF、LIF、FCSを含むゼラチンコートされたプレート培地へ移された。GDNFは、生体内で精子幹細胞の自己再生を刺激することが知られている。その他の因子は、始原生殖細胞（PGC）を含む他の幹細胞の増殖や維持に影響を与えるということが知られている。

【0078】

本実験における培養の結果、多くの細胞は、一晩のインキュベート後にプレートに付着した。しかし、サイズが大きく、仮足があつたりすることで特徴的に認められる、少なからずの生殖細胞が、浮遊したままであった。浮遊している細胞は、活発なピペッティング後に第2培養プレートへ継代された。ほんのわずかの生殖細胞だけ元のゼラチンコートされたプレートに残され、第2プレートへ継代

された細胞は比較的濃縮された生殖細胞（図1（a）の矢印で示すもの）であった。継代された細胞は一週間以内に増殖してプレートの底に拡がり、丸く増殖した細胞は平坦な細胞層の上部でコロニーを形成した（図1（b）、（c）参照）。これらの一次コロニーの多くは、不鮮明な境界の密集した群から成るものであった（図1（c）参照）。細胞分裂およびコロニーの形成は、上述の成長因子なしでは起こらなかった。

【0079】

細胞はトリプシン処理によって分散され、10～14日間隔（この間隔をDIVと称する）で、生体外の新しい培養プレート（×1希釈）へ移された。コロニーは、約10日で本来の大きさに成長し、細胞は再び継代された（×1／2希釈）。コロニーが成長を続ける一方で、20DIV後には、平坦な形状の体細胞は徐々に消滅していった。それゆえ、2度目あるいは3度目の継代から、細胞はマイトマイシンCで不活性化されたマウス胎児線維芽細胞（MEF）で維持され、3～5日毎に1／3から1／4希釈の新しいMEFへ継代された。3～4週間までには、培養は比較的安定した状態に落ち着き、類似した形態のコロニーを発生させた（図1（d）参照）。興味深いことに、生体内で有糸分裂をする精原細胞と類似して増殖する細胞の鎖は、継代後にも観察される場合があった（図1（e）参照）。また、図1（e）において矢印で示すように、細胞の間に細胞間架橋が観察された。

【0080】

これらの結果は再現性を有し、同様の培養が20以上の別の実験から確立された。しかし、コロニーの派生はマウスの遺伝的背景により影響を受けた。つまり、ICRあるいはC57BL/6×DBA/2F1（BDF1）から培養を開始することは可能であったが、C57BL/6あるいは129/Sv系統からは不可能であった。

【0081】

この実験における培養細胞（すなわち、精子幹細胞）の増殖の様子を図2のグラフに示す。このグラフにおいて、横軸は培養開始からの経過日数を、縦軸は細胞数を示す。図2に示すように、約5ヶ月間にわたって細胞培養は継続され、口

グ・スケールで細胞増殖が持続することが確認された。また、培養開始から5ヶ月間で細胞数は約 10^{14} 倍に増殖した。

【0082】

以上の結果から、GDNF、bFGF、EGF、LIFという成長因子および白血病抑制因子の組合せは、試験管内（in vitro）において、幹細胞の可能性を有する精原細胞の増加を誘導することが示された。この結果に基づいて、増加した細胞を生殖系列幹細胞（GS細胞）と命名した。

【0083】

（2）培養細胞の性質について

培養された細胞の性質を評価するために、新生児グリーンマウス（Green Mouse）の精巣細胞が使用された（参考文献1参照）。これらのマウスのGFP遺伝子は、精原細胞を含むあらゆる場所で発現する。それゆえ、培養されたGFPを含む細胞は、UV照射下での観察によってフィーダー細胞から区別することができる。細胞培養はグリーンマウスから確立され、GFPを含む細胞の表面の特徴はフローサイトメトリーによって解析された。

【0084】

その結果を図3（a）～（f）に示す。図3に示す各図は、（a）から順に、 α 6-インテグリン、 β 1-インテグリン、EpCAM、EE2、c-kit、SSEA-1という分子マーカーを用いて解析を行った結果である。なお、黒の実線で囲む白色のものがコントロール免疫グロブリンの場合の結果であり、灰色で示すものが各分子マーカー（抗体）の場合の結果である。

【0085】

培養された細胞は、 α 6-インテグリンおよび β 1-インテグリン（精子幹細胞マーカー）、EpCAM（精原細胞マーカー）、EE2（精原細胞マーカー）に対してポジティブであった。

【0086】

また、多くの細胞はc-kit（分化した精原細胞マーカー）に対してネガティブであったが、弱い発現が確認され、これによっていくつかのコロニーが分化していることが示唆された。しかし、培養にc-kitリガンドSCFを加えることによ

って、コロニーの特徴や成長特性は変化しなかった。培養された細胞は S S E A - 1 (P G C マーカー) に対して完全にネガティブであった。これらの結果から、細胞の大部分は未分化の精原細胞の性質を有するということが分かった。

【0087】

(3) 精原細胞移植による幹細胞活性の決定

上記 (2) の結果に基づき、続いて、培養された細胞が本当に精子幹細胞であるか確認するために、精原細胞移植が実施された。

【0088】

精子幹細胞には、形態学上のはっきりした判定基準あるいは特異的マーカーがないため、信頼できる唯一の分析法は、不妊動物での精子形成の回復を確認することである。この実験では、グリーンマウスから 3 つの分離培養 (実験 1, 2, 3) が確立された。さらに、試験管中で幹細胞が増殖しているかを確認するために、異なる 2 つの時点で不妊マウスの精細管の中に細胞を移植し、形成されるコロニー数を測定した。

【0089】

具体的には、29～58日の培養期間経過後、細胞は収穫され、ブルファン処理されたヌードマウスの精細管へ移植された。また、4～21継代後に、細胞は移植のために 45～134 DIV で再び集められ、この期間中の幹細胞数の増加の測定が行われた。移植実験におけるコロニーは、移植から 7～8 週間後に UV 照射下で測定された。

【0090】

その結果を表 1 に示す。幹細胞数は 3 つの実験全てで増加していた。

【0091】

【表 1】

実験	移植後の日数	精巢に注入された 細胞数（ $\times 10^5$ ）	精巢における コロニー数	コロニー数／ 10^5 細胞		各移植間の 細胞数の増加	幹細胞数の 増加（倍）
				(平均土標準誤差)	(平均土標準誤差)		
1	46 (6)	2.0	33.6±2.0	16.8±1.0		6.9×10^7	1.9×10^7
	107 (21)	1.6	7.4±2.9	4.6±1.8		127	692
	134 (27)	0.3	7.6±4.1	25.2±13.8			
2	29 (3)	3.4	67.4±11.1	20.1±3.3		38.0	11.2
	45 (7)	1.6	9.5±0.9	5.9±0.5			
3	58 (9)	2.0	7.5±3.7	3.8±1.9		2.0×10^6	4.2×10^6
	113 (22)	0.4	3.2±2.1	8.0±5.2			

【0092】

新生児の精巣における幹細胞の数は、 10^5 細胞につき3.4個であるので、この結果からも培養開始から134日間で幹細胞が約 5×10^{12} 倍に増加したことが示される。またこの実験において、幹細胞活性を有する最長の培養は、移植分析によって確認されるように、27継代（ 7×10^{11} 倍の増加）で134日間維持され、細胞は160日以上（トータルの細胞数で 2×10^{14} 倍の増加）、特徴的な形態を保持しながら成長を続けた（図2参照）。これらの結果は、細胞がその数を積極的に増加させていることを示すものである。

【0093】**(4) 培養幹細胞を移植された不妊の雄における生殖力の回復**

最後に、移植実験で発生した生殖細胞が正常であるかどうかを確認するために、不妊のWBB6F1W/W^V（Wと称する）において、培養細胞移植によって生殖力が回復するか試みられた。これらのマウスはc-kit遺伝子欠陥によって、生まれつき生殖力を欠いている。

【0094】

ここでは、2つの実験が実施された。精巣細胞は第1の実験では40日間、第2の実験では91日間培養され、両方の実験ともに免疫抑制された遺伝的な系統の異なる3つのW仔マウス（生後5～10日）へ移植された。移植後40日で第1の実験における受容体Wマウスの一匹が殺され、組織学的解析および生体外顕微受精に使用された。維持されたW受容体は、生殖力を回復するかどうかを決定するために野生型の雌と自然交配された。

【0095】

本実験によって得られたW受容体精巣の解析では、外見上正常な精子形成細胞を有する多数の精細管で満たされた培養細胞によって、広大なコロニー形成が行われることが実証された（図4（a）、（b）参照）。成熟した精子が観察された（図4（c）参照）。W受容体は欠陥を有する幹細胞において精子を形成することができないので、移植実験でのホストマウスにおける精子形成は、培養されたドナー幹細胞由来のもののみである。子孫を発生するために、68個の生きた精子あるいは139個の伸長した精細胞が、他のWの精巣から集められ、BDF

1卵母細胞へ注入された。構築された207の胚のうち、培養において172個(83%)が24時間以内に2細胞へ分化した。11匹の偽妊娠した雌の輸卵管への移入後に、全部で59匹の子が生まれた(17匹の雄、29匹の雌、生後母マウスに食べられたものは含まず)。子孫は自然交配によっても獲得された。第1の実験では2つの受容体のうちの一つが、移植後74日目に7匹の子(雄3匹、雌4匹)を産んだ。そして、第2の実験では、3つの受容体のうちの一つが、移植後91日目に9匹の子(雄5匹、雌4匹)を産んだ。両方の実験では、仔の起源となるドナーがUV照射下で蛍光によって確認された(図4(d)参照)。仔は生殖能力を有していることが確認された。これらの結果から、培養細胞から分化した生殖系列は精子を形成することができ、正常な子孫を残すことができることが確認された。

【0096】

【発明の効果】

以上のように、本発明の精子幹細胞の増殖方法は、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、白血病抑制因子(LIF)、および仔ウシ血清(FCS)を含む培地と、フィーダー細胞としてマウス胎児線維芽細胞(MEF)とを用いて精子幹細胞を培養することによって、精子幹細胞を増殖させることを特徴としている。

【0097】

上記の方法によれば、これまで生体外(すなわち、in vitro)で長期間増殖させることができなかった精子幹細胞を増殖させることが可能となる。これによって、各分野への応用が期待されていながら、これまで効率的な増殖方法が見つかりていなかっただために、その応用範囲が制限されていた精子幹細胞を有効に利用することが可能となる。

【0098】

そして、上記の方法によって得られた本発明の精子幹細胞は、実用可能なレベルにまで増殖されたものであるため、生体実験、医学的研究、バイオテクノロジーなどといった種々の分野において発生工学的に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

(a)～(e)は、本実施例において、新生児マウスの精巣細胞からG S細胞コロニーへの発達を顕微鏡で観察した結果を示す図である。(a)では、1 D I V後にゼラチンコートされたプレートから集められた浮遊細胞を示す。(b)では、4 D I Vにおいて、細胞が小さなコロニーを形成し始める様子を示す。(c)では、8 D I VでのG S細胞コロニーを示す。(d)では、95 D I VでのM E Fフィーダー細胞上のG Sコロニーを示す。(e)では、95 D I Vでの増殖する細胞による鎖形成を示す。

【図2】

本実施例において培養されたG S細胞の増殖を示すグラフであり、具体的には、G F P標識でフィーダー細胞と区別できるG S細胞の数を測定したものである。

【図3】

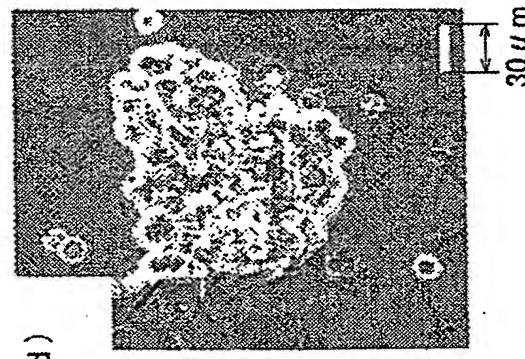
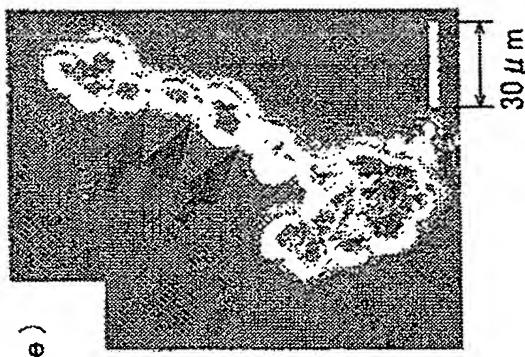
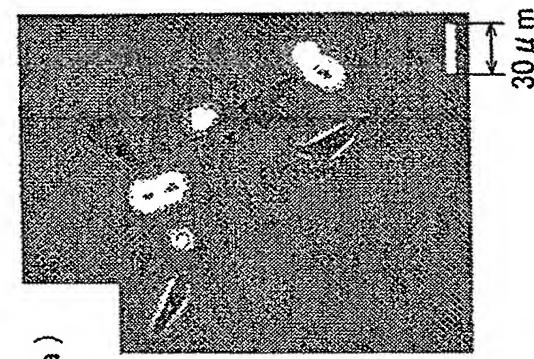
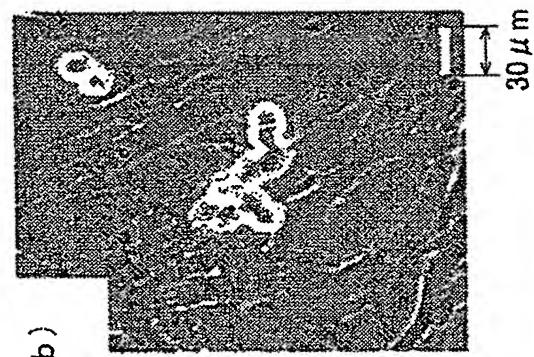
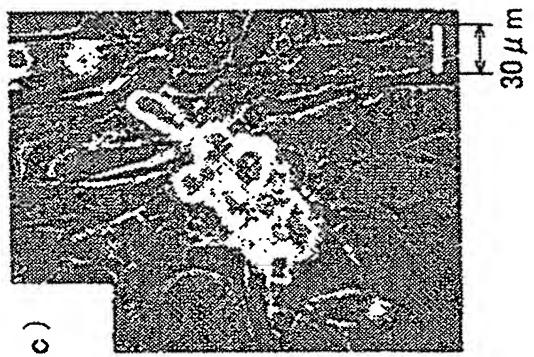
(a)～(f)は、本実施例において、各分子マーカーを用いて、フローサイトメトリーによって培養細胞の性質を調査した結果を示すグラフである。なお、(a)～(f)に示す各グラフは、分子マーカーとして、(a)から順に、 α 6-インテグリン、 β 1-インテグリン、E p C A M、E E 2、c-kit、S S E A -1をそれぞれ用いた場合である。

【図4】

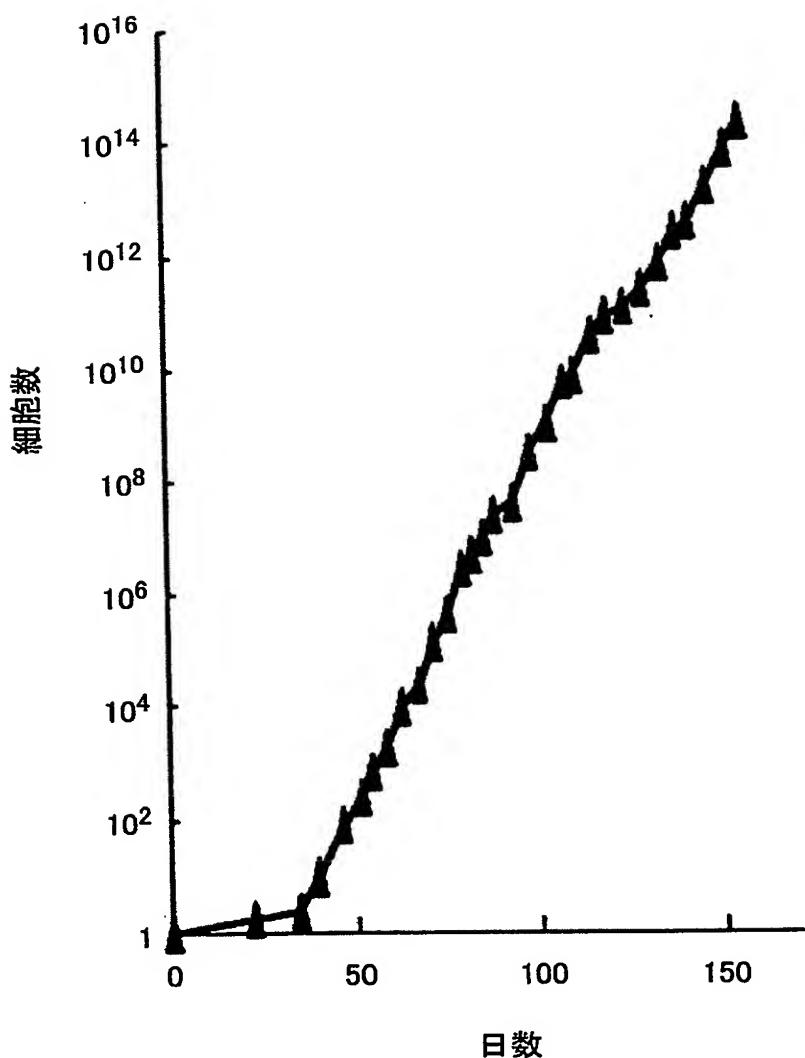
本実施例における、精原細胞移植後のG S細胞からの精子形成および子孫作製の結果を示す図である。(a)は、G F P標識されたドナーG S細胞由来の受容体精巣を観察した結果である。(b)および(c)は、W受容体精巣の組織学的な観察結果を示すものであり、(b)では正常な精子形成を、(c)では成熟した精子をそれぞれ示す。(d)は、U V照射下で蛍光を示すG F P標識されたG S細胞由来の子孫を示す。

【書類名】 図面

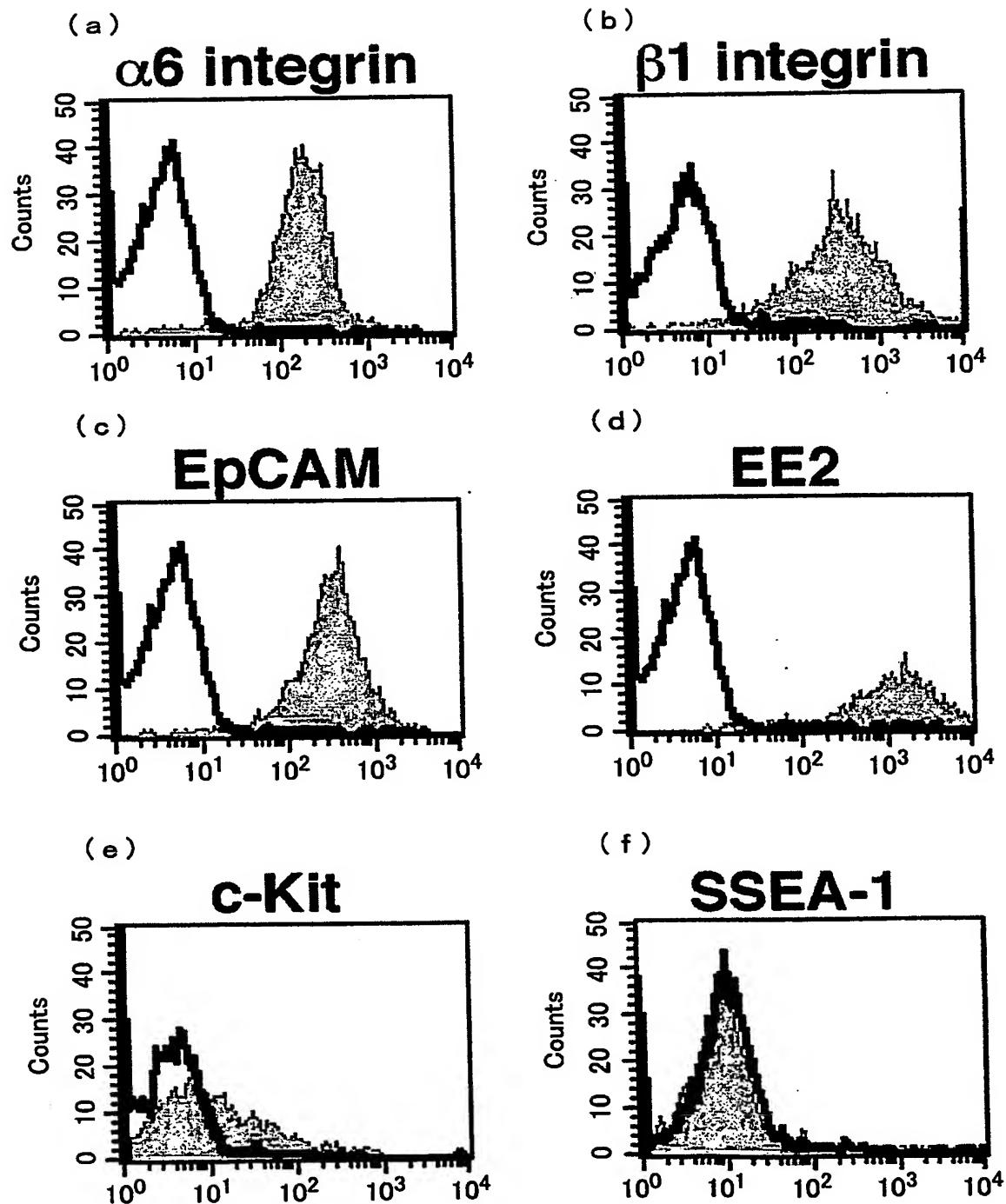
【図1】



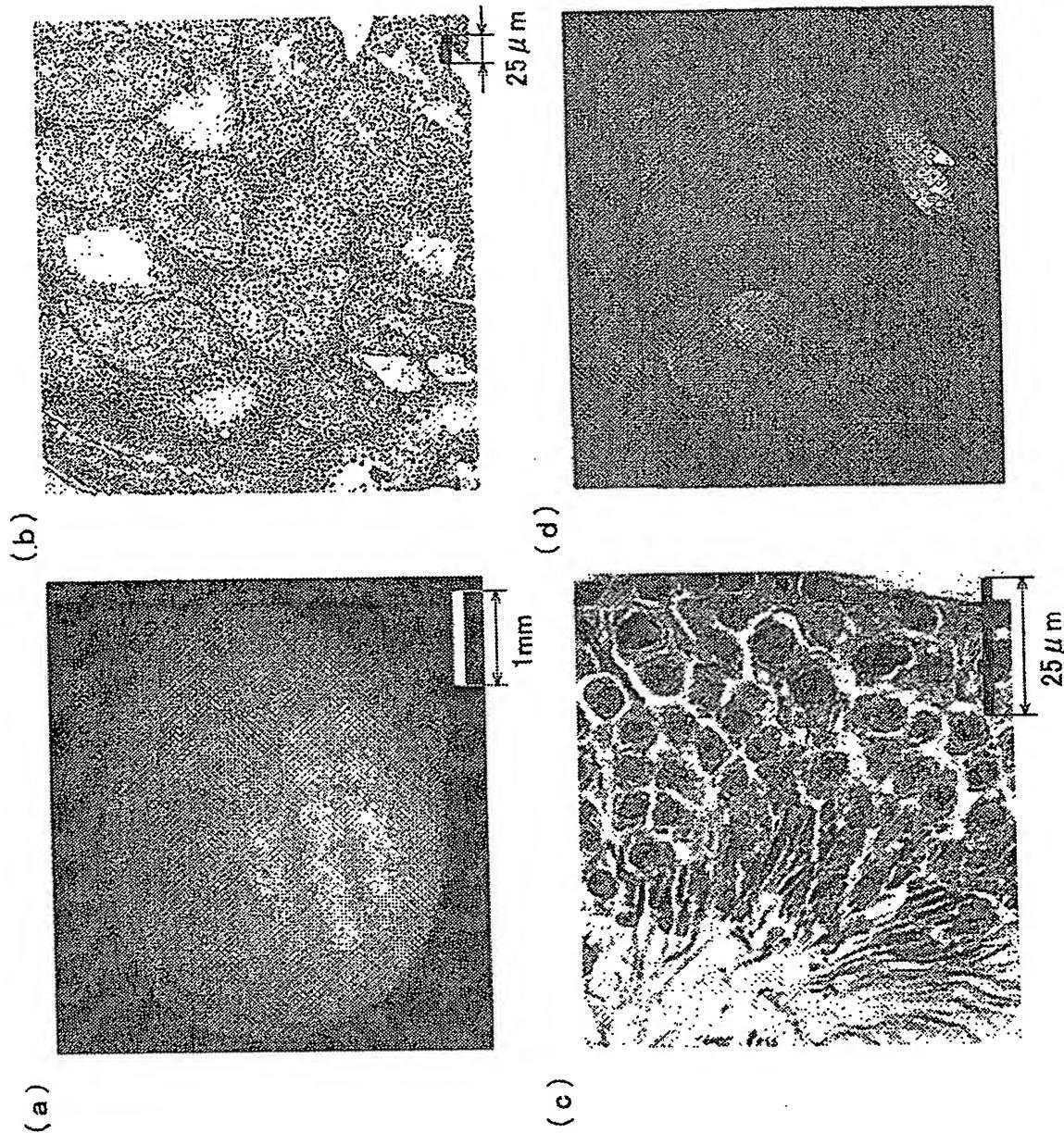
【図2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 哺乳類などの精子幹細胞を生体外（*in vitro*）で増殖させる方法、その方法を利用して増殖された精子幹細胞、および、精子幹細胞の生体外での増殖に用いられる培地添加剤キットを提供する。

【解決手段】 本発明の精子幹細胞の増殖方法は、以下の（1）、（2）を特徴とするものであり、この方法によって、精子幹細胞を発生工学的に利用可能な程度に生体外で増殖させることができる。

（1）精子幹細胞を培養するための培地（培養液）に、グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）、白血病抑制因子（LIF）、仔ウシ血清（FCS）が含まれるという点

（2）細胞培養時にフィーダー細胞としてマウス胎児線維芽細胞（MEF）を用いるという点

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-110821
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

【書類名】 出願人名義変更届
【整理番号】 A6266
【提出日】 平成16年 3月30日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003-110821
【承継人】
 【識別番号】 503310763
 【氏名又は名称】 社団法人芝蘭会
【承継人代理人】
 【識別番号】 100080791
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 高島 一
 【電話番号】 06-6227-1156
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 006965
 【納付金額】 4,200円
【その他】 上記の通り整理番号の変更をお願い致します。
【提出物件の目録】
 【物件名】 承継人であることを証明する書面 2
 【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出する。
 【物件名】 委任状 1
 【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出する。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-110821
受付番号	50400533198
書類名	出願人名義変更届
担当官	鈴木 夏生 6890
作成日	平成16年 5月11日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	503310763
【住所又は居所】	京都府京都市左京区吉田牛の宮町11-1
【氏名又は名称】	社団法人芝蘭会
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100080791
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区伏見町四丁目2番14号（藤村大和生命ビル） 高島國際特許事務所
【氏名又は名称】	高島 一

特願 2003-110821

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

特願 2003-110821

出願人履歴情報

識別番号 [503360115]

1. 変更年月日 2003年10月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏名 独立行政法人 科学技術振興機構

特願 2003-110821

出願人履歴情報

識別番号 [503310763]

1. 変更年月日 2003年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市左京区吉田牛の宮町11-1
氏 名 社団法人芝蘭会